

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/EP+ 99/05467
BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP99/5467

4

REC'D 26 NOV 1999	
WIPO	PCT

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 1. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 45 231.4

erofsky

11.23.10.98

Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, einer DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und einer DNA-Sequenz SEQ-ID No.5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens*, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

11 23. 00. 99

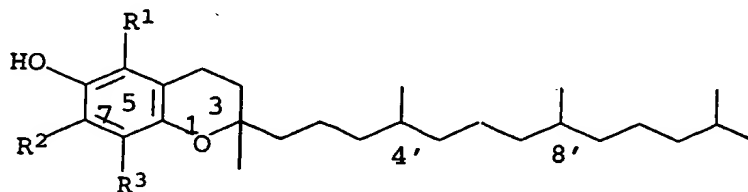
DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in 5 Pflanzen

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS), codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) und eine Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung von DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

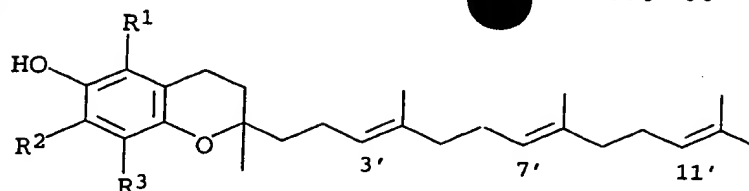
Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):



- 1a, α -Tocopherol: R¹ = R² = R³ = CH₃
1b, β -Tocopherol [148-03-8]: R¹ = R³ = CH₃, R² = H
1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: R¹ = H, R² = R³ = CH₃
1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: R¹ = R² = H, R³ = CH₃

M 23.10.99

5



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 10 2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt
 15 durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl
 sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt be-
 reits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können
 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert
 werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen
 20 gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Se-
 lektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise
 mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch
 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf
 Pflanzen der selben Art beschränkt.

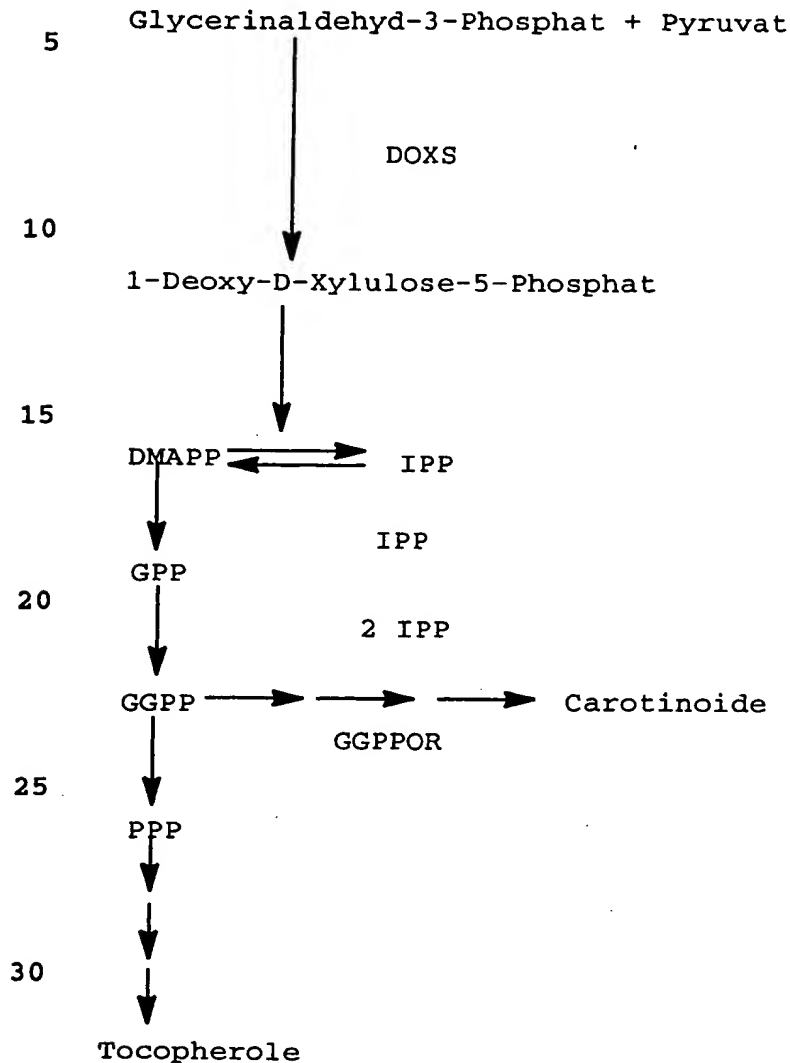
25

Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die
 Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthe-
 segene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen,
 dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren
 30 setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt
 ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, iden-
 tifiziert werden.

Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen
 35 lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus
 C_5 -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B.
 Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Iso-
 pren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B.
 Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem
 40 aromatischen Kern verbunden ist.

Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-
 CoA Einheiten, die über β -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und
 Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C_5), dem Isopentenylpy-
 45 rophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in
 vivo Fütterungsexperimente mit C^{13} gezeigt, daß in verschiedenen

Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschrieben wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414 (1), 129-134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94 (2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95 (5), 2100-2104 (1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400 (3), 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, wäh-

M 2 0 9 9
4

rend die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, *Physiol. Plant* 59 (1993), 50-60). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C₁₀) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C₁₅), Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C₂₀) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C₄₀-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol (Richter, *Biochemie der Pflanzen*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß direktional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, *Plant Mol. Biol.* 22(4), 589-602(1993); Fray et al., *Plant J.*, 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., *Plant Physiol.* 112. 1617-1624 (1996)).

11 23 10 00

Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens, eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens und eines Geranylgeranylpyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann auch durch Expression homologer oder anderer heterologer DOXS-Gene erreicht werden. DOXS-Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

Hierzu wird beispielsweise das DOXS-Gen aus E.coli (SEQ-ID No. 1; Rosa Putra et al., Tetrahedron Lett. 39(1998), 23-26; Acc. No.035440) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten wird der E.coli DOXS in einem weiteren Konstrukt eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Geranylgeranylpyrophosphat umgesetzt.

40

Um das vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von

M 23.10.99

Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ-ID No. 5) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der *Arabidopsis* GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

In Ausführungsbeispiel 4 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben.

Um das vermehrt zur Verfügung stehende PPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) durch Überexpression eines entsprechenden homologen oder heterologen Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Homogentisinsäure durch verstärkte Umsetzung von Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisinsäure erreicht.

cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 3 wird die Klonierung des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* beschrieben (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 3). Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der HPPD aus *Streptomyces* eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein HPPD-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 3 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus Pflanzen stammt.

Die Erhöhung der plastidären D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat, der Phytylpyrophosphat und der Homogentisinsäure Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung dieser Vorstufen gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophylle, Vitamin K und Phylloquinone in den Plastiden zur Verfügung steht.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS-, das HPPD-Gen und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt (Beispiel 5). Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K,



Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5, die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS-, das HPPD- bzw. das GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalinsynthase-Promotor
- 45 - außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

M 23.10.99

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS-, HPPD-, bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS-,HPPD- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein

M 23 00

chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 5 Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Inter- 10 science (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen ent- 15 sprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 20 30 (1996), 781-792).

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die 25 Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Unter- 30 einheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

35 Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

40

45

M 23.10.99
10

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTGC
15 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA
TCC_BamHI

pTP10

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
10 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTGC
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGTGC
GATCC_BamHI

15 pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTGC
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGG
20 ATCC_BamHI

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS, HPPD
bzw. GGPPOR kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen
sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Be-
25 standteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS-,
HPPD- bzw. GGPPOR-Genabschnitten verschiedener Organismen beste-
hen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit
Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von
Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten
30 Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessan-
ten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer
Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert
werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßiger-
weise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten
35 Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente
miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange-
setzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio-
40 nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion die-
ser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker
1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions-
stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-
45 schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze

11 23. 09

sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen, ein HPPD-Gen und ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

M 23.10.99

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 5 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens, eines HPPD-Gens bzw. eines GGPPOR-Gens enthalten.

10

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, 15 beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

- 20 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet 25 sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, 30 SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

35

- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung. 40

- Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin 45 K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

13

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

20

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-,HPPD- bzw. GGPPOR-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepasste, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS, HPPD bzw. GGPPOR kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigt. Mutationen umfassen Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS-,HPPD- bzw. GGPPOR-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin

14 10 99

enthaltenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das DOXS-, HPPD- bzw. GGPPOR-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der



Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des DOXS-, des HPPD- und des GGPPOR-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS-, HPPD- und GGPPOR-Gens kann beispielsweise in vitro durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS-, des HPPD- bzw. des GGPPOR-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 5 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

M 23.10.99
16

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 1, einer für die HPPD kodierenden Gensequenz SEQ-ID NO: 3 und einer für die GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ-ID No. 5 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegen 5 über Inhibitoren der DOXS, der HPPD und der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

10

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.

15

- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1, eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS, der HPPD und der GGPPOR durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen.

20

25

- Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1, SEQ-ID No. 3 und SEQ-ID No. 5 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS-, einer HPPD- und einer GGPPOR-DNA-Sequenz in Pflanzen.

30

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, 35 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

45



Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitro-
10 gen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

15

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

20

Beispiel 1

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

25

Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert
30 wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-
35 Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37
40 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

45

M 23. 10. 99
18

Beispiel 2

Isolierung der DOXS aus E. coli

- 5 Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'
- 10 (Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem
- 15 Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:
- 20
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C
- 25 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen ent-
- 30 sprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 3 und 4 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:
- 35
- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192
- 40 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-termination.

19

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

- 10 Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ-ID No. 1). Dabei wurden zwei
- 15 nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

20 Beispiel 3

Klonierung des Gens einer HPPD aus Streptomyces avermitilis U11864

- 25 Isolierung genomischer DNA des Bakteriums Streptomyces avermitilis U11864:

- Eine Kultur von Streptomyces avermitilis U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für
- 30 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/
- 35 Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die
- 40 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen
- 45 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

M 23.10.99
20

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al., 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das

- 5 Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA-CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

10

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 15 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

- Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin), vor
25 dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

- Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im
30 Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre
35 Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionstermination.

45

M 23. 21

Beispiel 4

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*5 Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfaltetten Blättern von *Arabidopsis thaliana*:

Voll entfaltete Blätter von *A. thaliana* wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend
10 im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach
10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand
15 in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-
20 Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt.

Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von *A. thaliana*:

- 25 20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetat-lösung und 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 µl Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.
- 35 Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur.J.Biochem. (1998) 251(1-2), 413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine SalI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid
40 am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGACGGTTACACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGATAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).

11.23.10.99
22

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min
5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min
25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min

- 10 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft (SEQ ID No. 5). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restriktions-
- 15 onsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionster-
- 20 mination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, sollte das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert werden. Das Konstrukt ist
- 25 in Abbildung 7 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus).
- 30 Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

35 Beispiel 5

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS-, GGPPOR- und HPPD-DNA-Sequenzen

- 40 Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS, die GGPPOR und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der alle drei Gensequenzen enthält (Abbildung 8). Das GGPPOR-Gen war mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz versehen (wie in Beispiel 4 beschrieben). Der verwendete pBinAR-Hyg Vektor
- 45 vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromy-

M 23. 23

cin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCCGCGCCGCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stopp-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase von Promega GmbH, Mannheim nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min
5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min
20 25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR-Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR2-TP-p-HPPD.

Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR2-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das p-HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al. 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors anlagert (kursiv geschrieben) lautet 5'-ATAAGCTTCATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGAC-AATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen

M 33.10.99
24

Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721)
übertragen.

Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Trans-
ketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssi-
gnal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den
Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligo-
nukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) an-
lagert lautet 5'-ATGAATTCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des
Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv
geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGA-
G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH,
Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-
Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit
der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-
Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend ge-
schnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrie-
ben die Sequenz der HPPD enthielt.

Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das
GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA
des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-
termination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den
Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle
angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den
Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-
GAGTCAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich
an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet
5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde
mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach
Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH,
Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch
Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als
XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertra-
gen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenzen der HPPD
und der DOXS enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-
GGPPOR-HPPD (Abbildung 8), dessen Fragmente folgende Bedeutung
haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-
Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Vi-
rus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Trans-
ketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält
das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids
pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination.



Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

Beispiel 6

5

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DOXS, der HPPD und der GGPPOR transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtyllessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

Beispiel 7

30

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS, der HPPD und der GGPPOR verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v)

H 2 3 1 0 9 9
26

Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H₂O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H₂O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filter-

5 papier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalme-

10 dium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Lu-

15 ria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der

20 Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt,

25 vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explantate für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-

30 Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten ent-

35 fernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor

40 verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in

45 Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds,

M 23. 00. 99
27

Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 8

5

Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS, der HPPD und der GGPPOR wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die α -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

20

25

30

35

40

45

28 23.10.99

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 067056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698
- (H) TELEFAX: 0621-60-48821

(ii) ANMELDETITEL: DNA-Sequenzen codierend für eine DOXS, eine HPPD und eine GGPPOR und deren Überexpression in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1863 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase
- (B) STAMM: E.coli XL1 Blue

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1863

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	AGT	TTT	GAT	ATT	GCC	AAA	TAC	CCG	ACC	CTG	GCA	CTG	GTC	GAC	TCC	48
Met	Ser	Phe	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Ser	
1					5				10					15		
ACC	CAG	GAG	TTA	CGA	CTG	TTG	CCG	AAA	GAG	AGT	TTA	CCG	AAA	CTC	TGC	96
Thr	Gln	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Cys	
			20					25					30			
GAC	GAA	CTG	CGC	CGC	TAT	TTA	CTC	GAC	AGC	GTG	AGC	CGT	TCC	AGC	GGG	144

Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly
 35 40 45
 CAC TTC GCC TCC GGG CTG GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC 192
 His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His
 50 55 60
 TAT GTC TAC AAC ACC CCG TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT 240
 Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His
 65 70 75 80
 CAG GCT TAT CCG CAT AAA ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC 288
 Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly
 85 90 95
 ACC ATC CGT CAG AAA GGC GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA 336
 Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu
 100 105 110
 AGC GAA TAT GAC GTA TTA AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT 384
 Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser
 115 120 125
 GCC GGA ATT GGT ATT GCG GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC 432
 Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg
 130 135 140
 CGC ACC GTC TGT GTC ATT GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG 480
 Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala
 145 150 155 160
 TTT GAA GCG ATG AAT CAC GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG 528
 Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val
 165 170 175
 ATT CTC AAC GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC 576
 Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu
 180 185 190
 AAC AAC CAT CTG GCA CAG CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG 624
 Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu
 195 200 205
 CGC GAA GGC GGG AAA AAA GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG 672
 Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu
 210 215 220
 CTG CTC AAA CGC ACC GAA GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC 720
 Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly
 225 230 235 240
 ACG TTG TTT GAA GAG CTG GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT 768
 Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly
 245 250 255
 CAC GAT GTG CTG GGG CTT ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG 816
 His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu
 260 265 270
 AAA GGC CCG CAG TTC CTG CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT 864
 Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr
 275 280 285

41231099
90

GAA CCG GCA G	AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC ACC GTG CCT AAA TTT	912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe		
290	295 300	
GAT CCC TCC AGC GGT TGT TTG CCG AAA AGT AGC GGC GGT TTG CCG AGC	960	
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser		
305	310 315 320	
TAT TCA AAA ATC TTT GGC GAC TGG TTG TGC GAA ACG GCA GCG AAA GAC	1008	
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp		
	325 330 335	
AAC AAG CTG ATG GCG ATT ACT CCG GCG ATG CGT GAA GGT TCC GGC ATG	1056	
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met		
	340 345 350	
GTC GAG TTT TCA CGT AAA TTC CCG GAT CGC TAC TTC GAC GTG GCA ATT	1104	
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile		
	355 360 365	
GCC GAG CAA CAC GCG GTG ACC TTT GCT GCG GGT CTG GCG ATT GGT GGG	1152	
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly		
	370 375 380	
TAC AAA CCC ATT GTC GCG ATT TAC TCC ACT TTC CTG CAA CGC GCC TAT	1200	
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr		
	385 390 395 400	
GAT CAG GTG CTG CAT GAC GTG GCG ATT CAA AAG CTT CCG GTC CTG TTC	1248	
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe		
	405 410 415	
GCC ATC GAC CGC GCG GGC ATT GTT GGT GCT GAC GGT CAA ACC CAT CAG	1296	
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln		
	420 425 430	
GGT GCT TTT GAT CTC TCT TAC CTG CGC TGC ATA CCG GAA ATG GTC ATT	1344	
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile		
	435 440 445	
ATG ACC CCG AGC GAT GAA AAC GAA TGT CGC CAG ATG CTC TAT ACC GGC	1392	
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly		
	450 455 460	
TAT CAC TAT AAC GAT GGC CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC	1440	
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn		
	465 470 475 480	
GCG GTC GGC GTG GAA CTG ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA	1488	
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys		
	485 490 495	
GGC ATT GTG AAG CGT CGT GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT	1536	
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly		
	500 505 510	
ACG CTG ATG CCA GAA GCG GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG	1584	
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr		
	515 520 525	
CTG GTC GAT ATG CGT TTT GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG	1632	
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu		

31 23 00 00

530	535	540	
GAA ATG GCC GCC AGC CAT GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC			1680
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala			
545	550	555	560
ATT ATG GGC GGC GCA GGC AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT			1728
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His			
565	570	575	
CGT AAA CCA GTA CCC GTG CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT			1776
Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile			
580	585	590	
CCG CAA GGA ACT CAG GAA GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC			1824
Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala			
595	600	605	
GCT GGT ATG GAA GCC AAA ATC AAG GCC TGG CTG GCA TA			1863
Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala			
610	615	620	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 620 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Phe	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Ser
1				5					10					15	
Thr	Gln	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Cys
			20					25					30		
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly
			35				40					45			
His	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	His
		50				55					60				
Tyr	Val	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Trp	Asp	Val	Gly	His
65				70					75					80	
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly
				85					90					95	
Thr	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Gly	Glu
			100					105					110		
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser
		115					120					125			
Ala	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg
	130					135						140			
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala
145					150					155				160	
Phe	Glu	Ala	Met	Asn	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Val
			165					170					175		
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu
			180					185					190		

32 23 10 99

Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu
	195						200					205			
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu
	210					215					220				
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Glu	Glu	His	Ile	Lys	Gly	Met	Val	Val	Pro	Gly
225					230					235					240
Thr	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly
			245						250					255	
His	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu
		260						265					270		
Lys	Gly	Pro	Gln	Phe	Leu	His	Ile	Met	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr
	275						280					285			
Glu	Pro	Ala	Glu	Lys	Asp	Pro	Ile	Thr	Phe	His	Ala	Val	Pro	Lys	Phe
	290					295					300				
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Cys	Leu	Pro	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser
305					310						315				320
Tyr	Ser	Lys	Ile	Phe	Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Thr	Ala	Ala	Lys	Asp
			325						330					335	
Asn	Lys	Leu	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Met	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Met
		340						345					350		
Val	Glu	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Pro	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Ala	Ile
	355						360					365			
Ala	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Gly
	370					375					380				
Tyr	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr	Phe	Leu	Gln	Arg	Ala	Tyr
385				390						395					400
Asp	Gln	Val	Leu	His	Asp	Val	Ala	Ile	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Phe
			405						410					415	
Ala	Ile	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Gln	Thr	His	Gln
		420						425				430			
Gly	Ala	Phe	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Met	Val	Ile
	435						440					445			
Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Glu	Asn	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Leu	Tyr	Thr	Gly
	450					455					460				
Tyr	His	Tyr	Asn	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn
465				470					475						480
Ala	Val	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Gly	Lys
			485						490					495	
Gly	Ile	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Phe	Gly
		500						505					510		
Thr	Leu	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Thr
	515						520					525			
Leu	Val	Asp	Met	Arg	Phe	Val	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Ile	Leu
	530					535					540				
Glu	Met	Ala	Ala	Ser	His	Glu	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Glu	Asn	Ala
545				550						555					560
Ile	Met	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Met	Ala	His

33 23 33 33

565

570

575

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile
580 585 590

Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala
595 600 605

Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala
610 615 620

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1469 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase

(B) STAMM: Streptomyces avermitilis

(C) INDIVIDUUM ISOLAT: U11864

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 218..1138

(x) VERÖFFENTLICHUNGSIONFORMATION:

(A) AUTORS: Reindl, Andreas

(G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GATATCCGAG CGCCGCCGGG TCCACTGCGG TCCGAAGCCG CGGATGACTC CATTGACTG	60
AAGCCGGTCG AGCCGCGCCT GCACGGTGCC GCGCGCGACC CCGAGCCGCC GGGACATCTC	120
GAGCACTCCG ATGCGCGGCT CCCGCGCCAG CAGCACCAGG AGCCGGCCGT CCAGATGATC	180
GATCGCCACG GCAGCCCCTC CAGTGGTCAT CCTGTAC ATG CAG CCC CAC GCC ATG	235
Met Gln Pro His Ala Met	
1 5	
GGC GGT GCA CTG AAC ACA TTG TCC AGC GGA CAA GCC AAC TAT TGC GCA	283
Gly Gly Ala Leu Asn Thr Leu Ser Ser Gly Gln Ala Asn Tyr Cys Ala	
10 15 20	
CCT TGC GGA ACG GAG CGA CCC TGC CGC CAT GAC GCA GAC CAC ACA CCA	331
Pro Cys Gly Thr Glu Arg Pro Cys Arg His Asp Ala Asp His Thr Pro	
25 30 35	
CAC TCC CGA CAC CGC CCG GCA GGC CGA CCC CTT CCC GGT GAA GGG AAT	379
His Ser Arg His Arg Pro Ala Gly Arg Pro Leu Pro Gly Glu Gly Asn	
40 45 50	
GGA CGC GGT CGT CTT CGC CGT AGG CAA CGC CAA GCA GGC CGC GCA CTA	427
Gly Arg Gly Arg Leu Arg Arg Arg Gln Arg Gln Ala Gly Arg Ala Leu	
55 60 65 70	
CTC CAC CGC CTT CGG CAT GCA GCT TGT GGC GTA CTC CGG ACC GGA GAA	475

34

A 5x5 grid of dots forming the number 2. The dots are arranged as follows: Row 1: (1,1), (1,2), (1,3), (1,4), (1,5); Row 2: (2,1), (2,2), (2,3), (2,4), (2,5); Row 3: (3,1), (3,2), (3,3), (3,4), (3,5); Row 4: (4,1), (4,2), (4,3), (4,4), (4,5); Row 5: (5,1), (5,2), (5,3), (5,4), (5,5). The number 2 is formed by dots at (1,1), (1,2), (1,3), (1,4), (1,5), (2,1), (2,2), (2,3), (2,4), (2,5), (3,1), (3,2), (3,3), (3,4), (3,5), (4,1), (4,2), (4,3), (4,4), (4,5), (5,1), (5,2), (5,3), (5,4), (5,5).

A 3x3 grid of dots. The first column has 5 dots (top to bottom: empty, dot, dot, dot, dot). The second column has 5 dots (top to bottom: dot, dot, empty, dot, dot). The third column has 3 dots (top to bottom: dot, dot, empty). This forms the number 12.

Leu	His	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Ala	Cys	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	
				75					80					85		
CGG	CAG	CCG	CGA	GAC	CGC	TTC	GTA	CGT	CCT	CAC	CAA	CGG	CTC	GGC	ACG	523
Arg	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Arg	Pro	His	Gln	Arg	Leu	Gly	Thr	
			90					95					100			
CTT	CGT	CCT	CAC	CTC	CGT	CAT	CAA	GCC	CGC	CAC	CCC	CTG	GGG	CCA	CTT	571
Leu	Arg	Pro	His	Leu	Arg	His	Gln	Ala	Arg	His	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	
		105					110					115				
CCT	CGC	CGA	CCA	TGT	GGC	CGA	GCA	CGG	CGA	CGG	CGT	CGT	CGA	CCT	CGC	619
Pro	Arg	Arg	Pro	Cys	Gly	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Arg	
		120				125					130					
CAT	CGA	GGT	CCC	GGA	CGC	CCG	CGC	CGC	CCA	CGC	GTA	CGC	GAT	CGA	GCA	667
His	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Val	Arg	Asp	Arg	Ala	
135				140					145					150		
CGG	CGC	CCG	CTC	GGT	CGC	CGA	GCC	GTA	CGA	GCT	GAA	GGA	CGA	GCA	CGG	715
Arg	Arg	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Ala	Arg	
			155					160				165				
CAC	GGT	CGT	CCT	CGC	CGC	GAT	CGC	CAC	CTA	CGG	CAA	GAC	CCG	CCA	CAC	763
His	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Arg	His	Leu	Arg	Gln	Asp	Pro	Pro	His	
			170			175					180					
CCT	CGT	CGA	CCG	GAC	CGG	CTA	CGA	CGG	CCC	CTA	CCT	CCC	CGG	CTA	CGT	811
Pro	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	
		185				190					195					
GGC	CGC	CGC	CCC	GAT	CGT	CGA	ACC	GCC	CGC	CCA	CCG	CAC	CTT	CCA	GGC	859
Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Pro	Gly	
		200				205				210						
CAT	CGA	CCA	CTG	CGT	CGG	CAA	CGT	CGA	GCT	CGG	CCG	GAT	GAA	CGA	ATG	907
His	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Met	
215				220					225					230		
GGT	CGG	CTT	CTA	CAA	CAA	GGT	CAT	GGG	CTT	CAC	GAA	CAT	GAA	GGA	GTT	955
Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gly	His	Gly	Leu	His	Glu	His	Glu	Gly	Val	
			235					240				245				
CGT	GGG	CGA	CGA	CAT	CGC	GAC	CGA	GTA	CTC	GGC	GCT	GAT	GTC	GAA	GGT	1003
Arg	Gly	Arg	Arg	His	Arg	Asp	Arg	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Val	Glu	Gly	
		250				255					260					
CGT	GGC	CGA	CGG	CAC	GCT	CAA	GGT	CAA	GTT	CCC	GAT	CAA	CGA	GCC	CGC	1051
Arg	Gly	Arg	Arg	His	Ala	Gln	Gly	Gln	Val	Pro	Asp	Gln	Arg	Ala	Arg	
		265				270					275					
CCT	CGC	CAA	GAA	GAA	GTC	CCA	GAT	CGA	CGA	GTA	CCT	GGA	GTT	CTA	CGG	109



GTCCAGGACC GCCCGACGGT CTTCTTCGAG ATCATCGAAC GCCACGGCTC GATGGGATTC
 GGCAAGGGCA ACTTCAAGGC CCTGTTCGAG GCGATCGAGC GGGAGCAGGA GAAGCGGGGC
 AACCTGTAGG CGGCGCGGCC CGGG

1385

1445

1469

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 306 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Gln	Pro	His	Ala	Met	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly
1				5				10					15		
Gln	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ala	Pro	Cys	Gly	Thr	Glu	Arg	Pro	Cys	Arg	His
		20						25					30		
Asp	Ala	Asp	His	Thr	Pro	His	Ser	Arg	His	Arg	Pro	Ala	Gly	Arg	Pro
		35					40					45			
Leu	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg
	50					55				60					
Gln	Ala	Gly	Arg	Ala	Leu	Leu	His	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Ala	Cys	Gly
65					70				75					80	
Val	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	Arg	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Arg	Pro
			85					90						95	
His	Gln	Arg	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Pro	His	Leu	Arg	His	Gln	Ala	Arg
		100						105					110		
His	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Arg	Pro	Cys	Gly	Arg	Ala	Arg	Arg
		115					120					125			
Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Arg	His	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro
	130					135					140				
Arg	Val	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Val	Arg
145				150						155				160	
Ala	Glu	Gly	Arg	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Arg	His	Leu
			165					170				175			
Arg	Gln	Asp	Pro	Pro	His	Pro	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro
		180					185					190			
Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg
	195					200					205				
Pro	Pro	His	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala
	210				215						220				
Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Met	Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gly	His	Gly	Leu
225				230						235				240	
His	Glu	His	Glu	Gly	Val	Arg	Gly	Arg	Arg	His	Arg	Asp	Arg	Val	Leu
			245					250				255			
Gly	Ala	Asp	Val	Glu	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	His	Ala	Gln	Gly	Gln	Val
	260					265					270				
Pro	Asp	Gln	Arg	Ala	Arg	Pro	Arg	Gln	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Arg	Arg
	275					280					285				
Val	Pro	Gly	Val	Leu	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Pro	Ala	His	Arg	Ala	Glu

36 23 10 99

290

295

00

His Gly

305

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 1479 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzel

(D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 1..1401

(x) VERÖFFENTLICHUNGSIONFORMATION:

(A) AUTORS: 3-SEP-2000,

(G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

ATG GCG ACG ACG GTT ACA CTC AAA TCC TTC ACC GGA CTT CGT CAA TCA	48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser	
1 5 10 15	
TCA ACG GAG CAA ACA AAC TTC GTC TCT CAT GTA CCG TCA TCA CTT TCT	96
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
CTC CCT CAA CGA CGG ACC TCT CTC CGA GTA ACC GCA GCC AGG GCC ACT	144
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr	
35 40 45	
CCC AAA CTC TCC AAC CGT AAA CTC CGT GTC GCC GTC ATC GGT GGT GGA	192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly	
50 55 60	
CCA GCA GGC GGG GCA GCT GCA GAG ACT CTA GCA CAA GGA GGA ATC GAG	240
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu	
65 70 75 80	
ACG ATT CTC ATC GAG CGT AAG ATG GAC AAT TGC AAG CCT TGC GGT GGC	288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly	
85 90 95	
GCG ATT CCT CTC TGT ATG GTC GGA GAA TTC AAC TTG CCG TTG GAT ATT	336
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile	
100 105 110	
ATT GAT CGG AGA GTG ACG AAG ATG AAG ATG ATT TCG CCG TCG AAC ATT	384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile	
115 120 125	
GCT GTT GAT ATT GGT CGT ACG CTT AAG GAG CAT GAG TAT ATA GGT ATG	432
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met	
130 135 140	
GTG AGA AGA GAA GTT CTT GAT GCT TAT CTG AGA GAG AGA GCT GAG AAG	480



Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys	
145 150 155 160	
AGT GGA GCC ACT GTG ATT AAC GGT CTC TTC CTT AAG ATG GAT CAT CCG	528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro	
165 170 175	
GAG AAT TGG GAC TCG CCG TAC ACT TTG CAT TAC ACT GAG TAC GAT GGT	576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly	
180 185 190	
AAA ACT GGA GCT ACA GGG ACG AAG AAA ACA ATG GAG GTT GAT GCT GTC	624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val	
195 200 205	
ATT GGA GCT GAT GGA GCT AAC TCT AGG GTT GCT AAA TCT ATT GAT GCT	672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala	
210 215 220	
GGT GAT TAC GAC TAC GCA ATT GCA TTT CAG GAG AGG ATT AGG ATT CCT	720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro	
225 230 235 240	
GAT GAG AAA ATG ACT TAC TAT GAG GAT TTA GCT GAG ATG TAT GTT GGA	768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly	
245 250 255	
GAT GAT GTG TCG CCG GAT TTC TAT GGT TGG GTG TTC CCT AAG TGC GAC	816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp	
260 265 270	
CAT GTA GCT GTT GGA ACA GGT ACT GTG ACT CAC AAA GGT GAC ATC AAG	864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys	
275 280 285	
AAG TTC CAG CTC GCG ACC AGA AAC AGA GCT AAG GAC AAG ATT CTT GGA	912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly	
290 295 300	
GGG AAG ATC ATC CGT GTG GAG GCT CAT CCG ATT CCT GAA CAT CCG AGA	960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg	
305 310 315 320	
CCA CGT AGG CTC TCG AAA CGT GTG GCT CTT GTA GGT GAT GCT GCA GGG	1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly	
325 330 335	
TAT GTG ACT AAA TGC TCT GGT GAA GGG ATC TAC TTT GCT GCT AAG AGT	1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser	
340 345 350	
GGA AGA ATG TGT GCT GAA GCC ATT GTC GAA GGT TCA CAG AAT GGT AAG	1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys	
355 360 365	
AAG ATG ATT GAC GAA GGG GAC TTG AGG AAG TAC TTG GAG AAA TGG GAT	1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp	
370 375 380	
AAG ACA TAC TTG CCT ACC TAC AGG GTA CTT GAT GTG TTG CAG AAA GTG	1200
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val	
385 390 395 400	

38 10 99

TTT TAC AGA TCA AAT CCG GCT AGA GAA GCG TTT GTG GAG ATG TGT AAT 1248
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
405 410 415
GAT GAG TAT GTT CAG AAG ATG ACA TTC GAT AGC TAT CTG TAC AAG CGG 1296
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
420 425 430
GTT GCG CCG GGT AGT CCT TTG GAG GAT ATC AAG TTG GCT GTG AAC ACC 1344
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
435 440 445
ATT GGA AGT TTG GTT AGG GCT AAT GCT CTA AGG AGA GAG ATT GAG AAG 1392
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
450 455 460
CTT AGT GTT TAAGAAACAA ATAATGAGGT CTATCTCCTT TCTTCATCTC 1441
Leu Ser Val
465

TATCTCTCTT TTTTGTCTG TTAGTAATCT ATCTACAC 1479

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 467 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

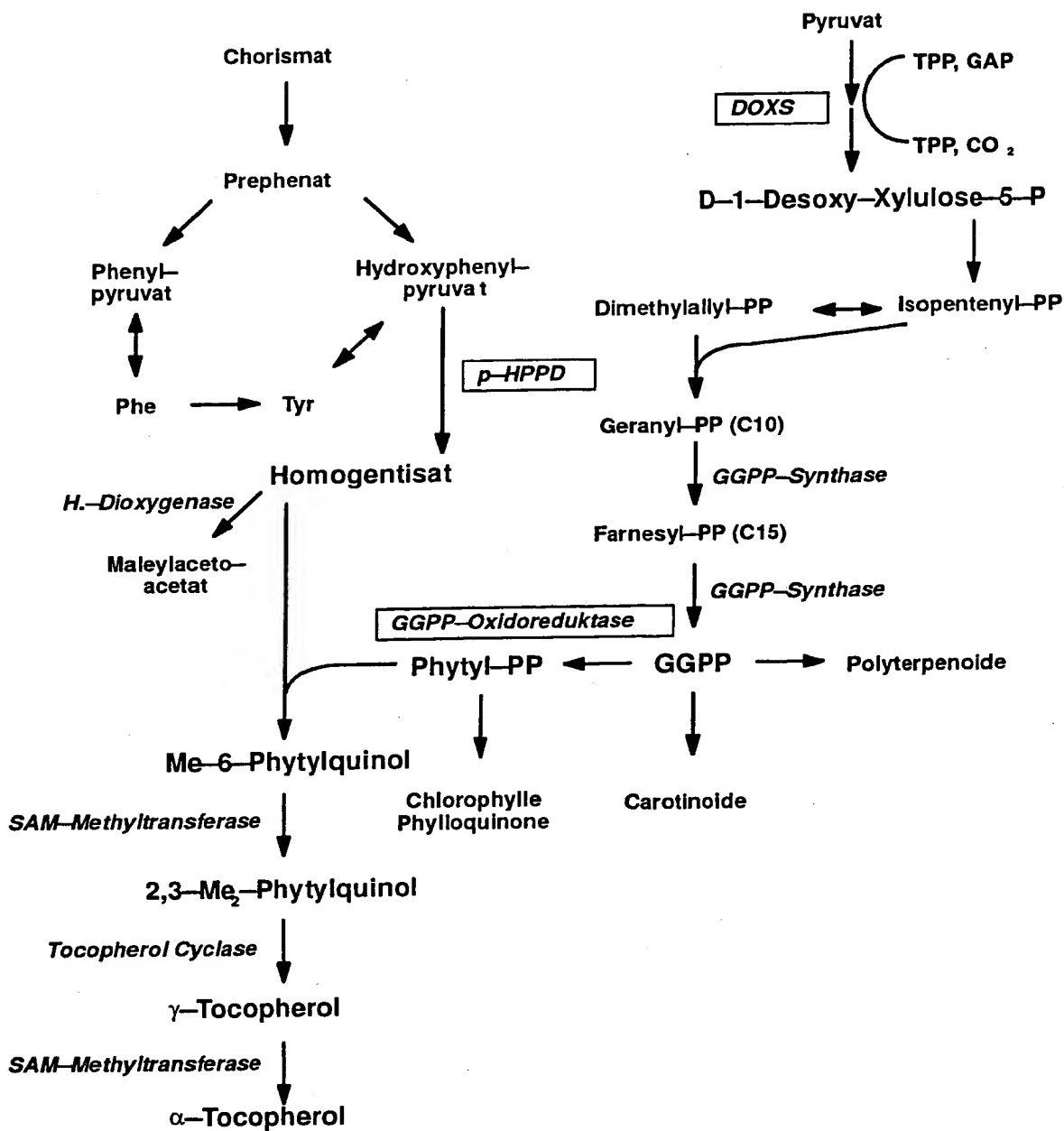
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser
1 5 10 15
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr
35 40 45
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly
50 55 60
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu
65 70 75 80
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly
85 90 95
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile
100 105 110
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile
115 120 125
Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met
130 135 140
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys
145 150 155 160
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro
165 170 175
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly
180 185 190

39

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val
195 200 205
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala
210 215 220
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro
225 230 235 240
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly
245 250 255
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp
260 265 270
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys
275 280 285
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly
290 295 300
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg
305 310 315 320
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly
325 330 335
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser
340 345 350
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys
355 360 365
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp
370 375 380
Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val
385 390 395 400
Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn
405 410 415
Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg
420 425 430
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr
435 440 445
Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys
450 455 460
Leu Ser Val
465

M 23. 10. 99

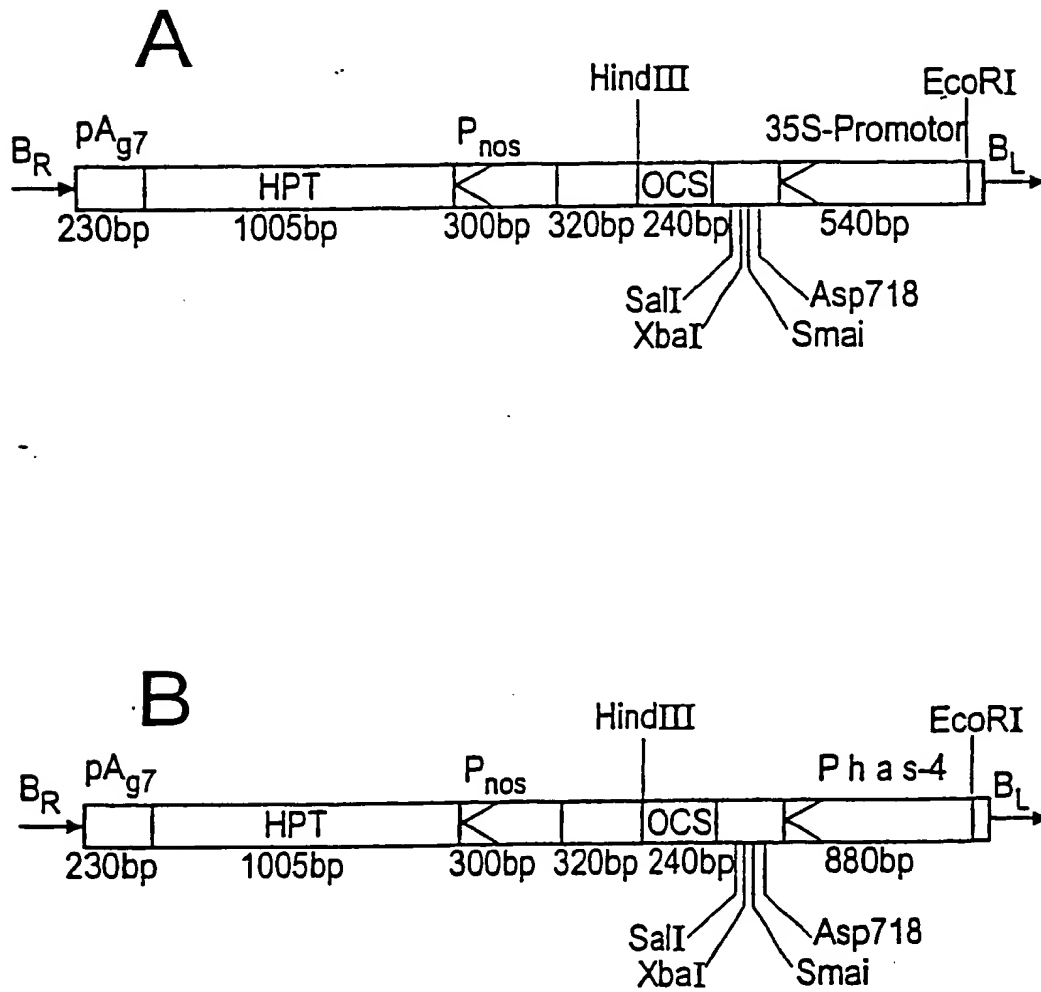
Abbildung



Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels

Abbildung 2

M 23. 00. 99



M 23 10 99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im Zytosol transgener Pflanzen

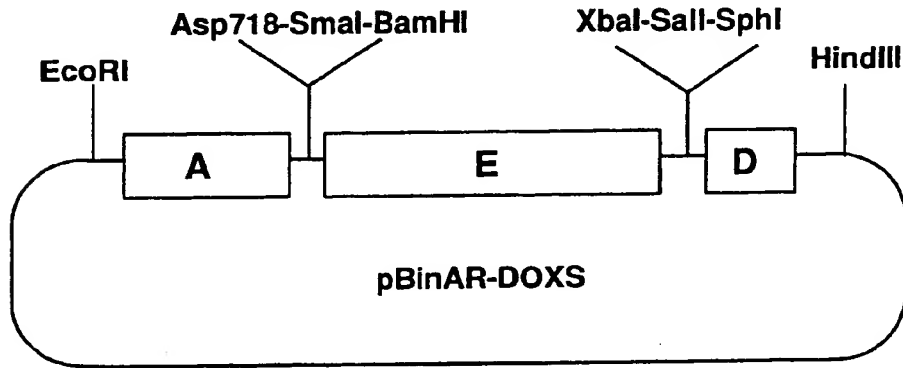
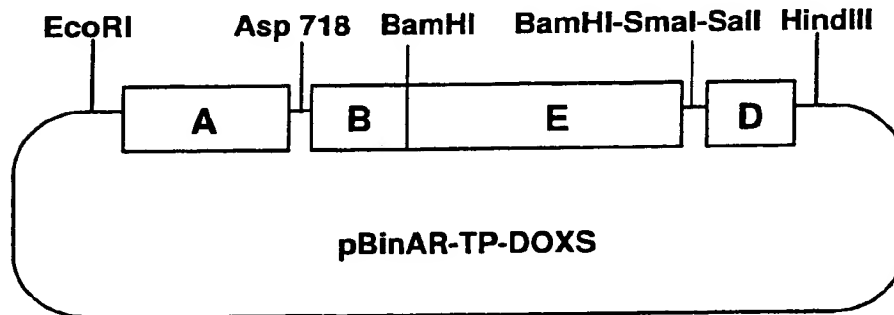


Abbildung 4

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im Plastiden transgener Pflanzen



M 23. 00. 99

Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Zytosol transgener Pflanzen

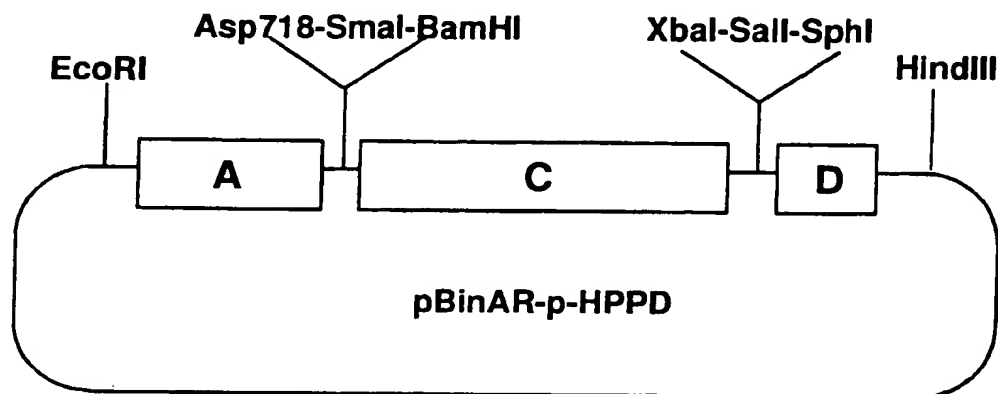
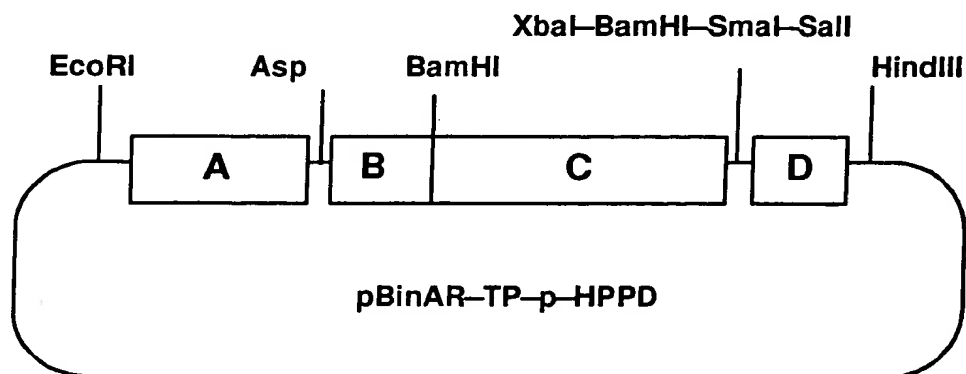


Abbildung 6

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen



M 23.10.99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in Plastiden transgener Pflanzen.

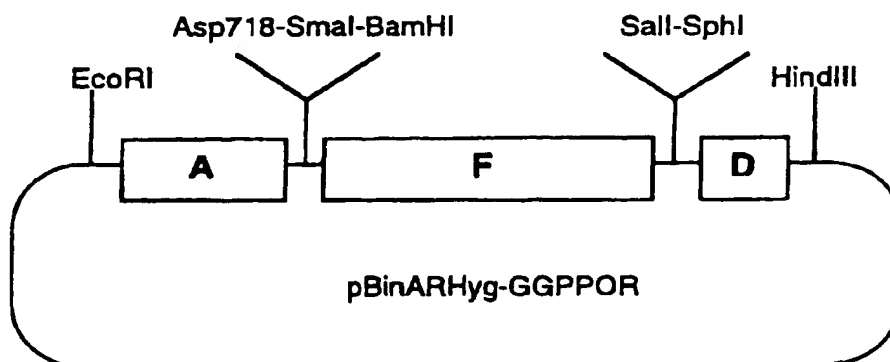
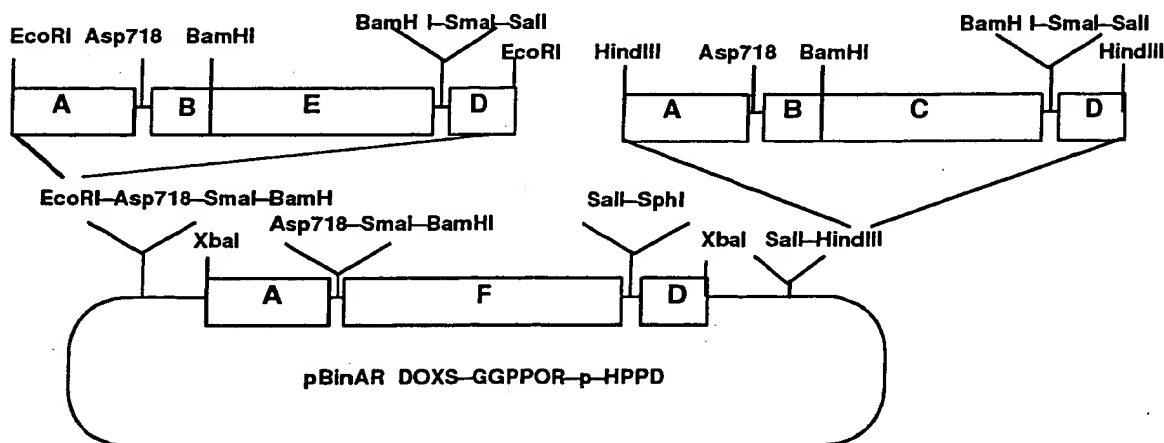


Abbildung 8

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus *E. coli*, des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* und des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* in den Plastiden transgener Pflanzen.





DNA-Sequenzen codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase, eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in 5 Pflanzen

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E
10 Biosyntheseleistung durch Überexpression einer 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase aus E.coli, einer Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus Streptomyces avermitilis und einer Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase aus Arabidopsis thaliana.

15

20

25

30

35

40

45

THIS PAGE BLANK (USPTO)